Revue suisse Zool.	Tome 91	Fasc. 4	p. 835-850	Genève, décembre 1984

Différenciation génétique entre populations des espèces *Neomys fodiens* et *N. anomalus* par électrophorèse des protéines (Mammalia, Soricidae)[1]

par

F. Catzeflis *

Avec 4 figures et 7 tableaux

Abstract

Genetic differentiation between populations of the species *Neomys fodiens* **and** *N. anomalus* **by protein electrophoresis (Mammalia, Soricidae).** — The shrews *Neomys fodiens* and *N. anomalus* are very similar to each other, by their general and skull morphology and by their karyotype. Moreover, these two aquatic species display a great ecological similarity, although there should be some differences between their respective niche as they live in syntopy in a few places. From these observations, some authors think that these two species must have a close relationship, and that their speciation must be of a recent event.

I have tried to quantify the genetic differences between a few populations of these two species by the electrophoresis of homologous proteins, assuming that each electromorph of an isozyme represents the expression of one allele of the corresponding structural gene.

The results of the biochemical variations analyses are as following:

— among the 31 isoproteins, there is a group of 11 monomorphic, that is showing only one electromorph in the 9 analysed samples; the 20 other are polymorphic, represented by 54 electrophoretic variants, of which 3 have been observed only in *N. anomalus*;

* Institut de Zoologie et d'Ecologie Animale, Bâtiment de Biologie, CH-1015 Lausanne, Suisse.

[1] Poster présenté à l'assemblée annuelle de la SSZ à Fribourg les 3 et 4 mars 1984.

— the genetic distances (calculated after Nei's formulae, 1972) between intraspecific populations are pretty high, contrarily to what is observed by many other species of Mammals;

— at the specific level, the genetic distance between *N. fodiens* and *N. anomalus* is 0,193 ± 0,032, a value which agrees with a recent cladogenesis between these two taxa.

These results are compared with those obtained by the same technique in other species of the family Soricidae.

Les musaraignes à mœurs aquatiques du genre *Neomys* Kaup sont représentées en Europe par deux espèces: *Neomys fodiens* Pennant, 1771 et *N. anomalus* Cabrera, 1907. Sympatriques dans la majeure partie de l'aire de distribution de *N. anomalus* — l'espèce dont la répartition est la moins vaste — ces deux musaraignes sont très semblables par leur morphologie générale (Corbet & Ovenden 1980), crânienne (revue dans Taberlet 1982) et par leur caryotype (Meylan 1966; Fredga & Levan 1969). De plus, *N. fodiens* et *N. anomalus* montrent une grande similarité écologique (Spitzenberger 1980) quoiqu'il y ait des différences suffisantes de leur niche écologique respective pour qu'elles ne s'excluent pas mutuellement (Niethammer 1977; Nores *et al.* 1982).

N. fodiens, qui montre d'importantes variations de taille — tant corporelle que crânienne —, est la plus spécialisée quant à l'habitat et de par sa morphologie; l'espèce la plus petite *N. anomalus* est la plus généraliste, capable d'occuper plus d'habitats terrestres et présente une moindre adaptation à la vie aquatique (Spitzenberger 1980; Tvrtkovic *et al.* 1980). Pour Spitzenberger (1980), *N. fodiens* est l'espèce moderne, la plus spécialiste, et qui a dérivé de l'espèce ancestrale *N. anomalus*. Quoiqu'il en soit, plusieurs auteurs (revue dans Spitzenberger) s'accordent à penser que *N. fodiens* et *N. anomalus* sont étroitement apparentées et que leur spéciation doit être un phénomène récent.

Le but de ce travail est d'étudier la variation biochimique à l'intérieur de plusieurs populations géographiques de *N. fodiens* et *N. anomalus* et d'estimer la différenciation génétique entre ces deux espèces par la méthode de l'électrophorèse des protéines homologues.

Les résultats obtenus sont ensuite discutés par rapport à ceux présentés par une méthode similaire chez les musaraignes des genres *Neomys* et *Sorex* (Gebczynski & Jacek 1980; Catzeflis *et al.* 1982) et *Crocidura* (Catalan & Poitevin, 1981; Catzeflis 1983).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tous les animaux utilisés pour cette étude ont été capturés vivants entre août 1978 et décembre 1982 à l'aide de trappes de type Longworth. Leurs peau et crâne, ainsi que des échantillons congelés de certains tissus, sont déposés à l'Institut de Zoologie et d'Ecologie Animale de l'Université de Lausanne.

L'origine géographique et l'effectif des échantillons analysés sont donnés au tableau 1 et à la figure 1.

Les données biométriques caractérisant chaque population (tableau 2) sont fondées sur 83 animaux (parmi lesquels 63 ont été analysés biochimiquement) et ont été prises sur l'animal récemment anesthésié (longueurs « tête et corps » — TC — et de la queue

— Q —) comme illustré par CORBET & OVENDEN (1980); la hauteur mandibulaire (= hauteur coronoide) a été mesurée sur la mandibule gauche selon BÜHLER (1964).



FIG. 1.

Origine géographique des 9 échantillons analysés. Carrés et traits continus: *N. fodiens :* 1 à 6. Triangles et traits discontinus: *N. anomalus :* 1 à 3.

L'analyse biochimique a été conduite comme décrite précédemment (CATZEFLIS *et al.* 1982) selon les procédures standardisées publiées par SELANDER *et al.* (1971); les méthodes pour la séparation (systèmes tampons, tensions électriques) et la détection (colorations histo-chimiques) des protéines étudiées sont résumées dans le tableau 3.

Espèce, population		Localité	Effectif
N.fodiens	Nfo-1	Les Haudères, Suisse	6
	Nfo-2	Bassins, Suisse	13
	Nfo-3	Ceretto, Italie	6
	Nfo-4	Opi, Italie	3
	Nfo-5	Brenthonne, France	5
	Nfo-6	Aland, Finlande	7
N.anomalus	Nan-1	Sion, Suisse	13
	Nan-2	Bassins, Suisse	3
	Nan-3	Candelario, Espagne	6

TABLEAU 1

Origine et effectif des échantillons étudiés.

Population et localité	Nbre ind.	HMD	TC	Q
Nfo-1 Haudères	8	4.69 ± 0.10	78.2 ± 7.6	60.2 ± 4.8
Nfo-2 Bassins	19	4.89 ± 0.13	82.7 ± 4.7	60.8 ± 3.0
Nfo-3 Ceretto	8	4.82 ± 0.03	82.7 ± 3.5	62.3 ± 3.0
Nfo-4 Opi	5	5.12 ± 0.08	87.4 ± 3.0	67.4 ± 2.1
Nfo-5 Brenthonne	5	4.89 ± 0.15	87.1 ± 4.2	59.9 ± 4.1
Nfo-6 Åland	7	4.64 ± 0.14	81.2 ± 2.9	58.4 ± 3.0
Nan-1 Sion	13	4.41 ± 0.07	80.1 ± 4.9	54.2 ± 2.0
Nan-2 Bassins	3	4.31 ± 0.08	82.3 ± 2.9	53.8 ± 1.9
Nan-3 Candelario	15	4.44 ± 0.12	76.1 ± 4.0	59.9 ± 1.8

TABLEAU 2

Données biométriques caractérisant les populations analysées par la biochimie. Hmd: hauteur mandibulaire; TC: longueur « tête et corps »; Q: longueur de la queue

TABLEAU 3

Méthodes utilisées pour la séparation et la détection des protéines. Les noms des enzymes sont suivis de leur numéro E.C. et de leur abréviation selon HARRIS et HOPKINSON (1976). *Systèmes tampons des gels et électrodes :* I: Tris-citrate pH 7.0 (AYALA *et al.* 1972) 5V/cm, 15 h; II: Hydroxide de lithium (SELANDER *et al.* 1971) 13 V/cm, 7 h; III: Amine-citrate (CLAYTON & TRETIAK 1972) 5V/cm, 15 h; IV: Tris-citrate pH 8.0 (DAVIDIAN-BRITTON 1976) 5V/cm, 8 h; VI: Tris-borate-EDTA (BREWER 1970) 7V/cm, 15 h; VII: Poulik (SELANDER *et al.* 1971) 12 V/cm, 7 h. *Coloration :* 1: SELANDER *et al.* 1971; 2: GRAF & MEYLAN 1980; 3: HARRIS & HOPKINSON 1976; 4: SHAW & PRASAD, 1970; 5: immersion dans une solution d'Amidoblack 10B (1% dans acide acétique 7%) pendant 30 minutes, puis différenciation dans de l'acide acétique 7%; 6: lecture directe sur le gel; a): adduction de beta-mercaptoéthanol 0.005 M à la solution tampon du gel

Enzymes	*Loci*	*Organe*	*Système*	*Coloration*
Aconitase 4.2.1.3-ACON	Acon-1	Cœur	IV	3
Créatine kinase 2.7.3.2-CK	Ck-1	Cœur	II	2
Estérases 3.1.1.1-ES	Es-1, Es-2, Es-3	Foie	II	1
Fumarase 4.2.1.2-FH	Fh-1	Foie	V	4
Glucose-phosphate isomérase 5.3.1.9-GPI	Gpi-1	Foie	V	2
Glucose-6-phosphate déhydrogénase 1.1.1.49-Gd	Gd-1	Rein	VI a)	2
Glutamate-oxaloacétate transaminase 2.6.1.1-GOT	Got-1, Got-2	Cœur	V	2
Glycérol-3-phosphate déhydrogénase 1.1.1.8-GPD	Gpd-1	Cœur	V	2
Hexokinase 2.7.1.1-HK	Hk-1	Rein	V	3
Isocitrate déhydrogénase 1.1.1.42-ICD	Icd-1, Icd-2	Rein	III a)	2
Lactate déhydrogénase 1.1.1.27-LDH	Ldh-1, Ldh-2	Rein	I	2
Malate déhydrogénase 1.1.1.37-MDH	Mdh-1, Mdh-2	Rein	I	2
Mannose phosphate isomérase 5.3.1.8-MPI	Mpi-1	Rein	IV	3
Peptidase E 3.4.11-PEPE	Pepe-1	Cœur	II	1
Phosphatase acide 3.1.3.2-ACP	Acp-1	Rein	V	4
Phosphoglucomutase 2.7.5.1-PGM	Pgm-1	Foie	VII	2
Phosphogluconate déhydrogénase 1.1.1.44-PGD	Pgd-1	Rein	VI a)	2
Superoxyde dismutase 1.15.1.1-SOD	Sod-1, Sod-2, Sod-3	Rein	III a)	3
Xanthine déhydrogénase 1.2.3.2-XDH	Xdh-1	Foie	VII	1
Protéines hémales				
Albumine ALB	Alb-1	Foie	II	5
Hémoglobine HBB	Hbb-1	Foie	I	6
Protéine-2 PROT-2	Prot-2	Foie	II	5
Transferrine TRF	Trf-1	Foie	II	5

Une description des électromorphes des protéines non-enzymatiques est la suivante:

- Hémoglobine: une seule bande, cathodique dans le système choisi, qui est interprétée comme l'assemblage des chaînes alpha et bêta et assimilée par défaut à l'expression d'un seul locus;
- Protéine-2: une seule bande, à migration la plus cathodique, monomère;
- Transferrine et Albumine: monomères, toutes deux à migration anodique; la Transferrine se déplace à environ une demi-distance par rapport à l'Albumine, cette dernière étant assimilée à l'électromorphe le plus anodique dans le système choisi.

La désignation des différents électromorphes a été établie par rapport à ceux observés chez les Musaraignes des genres *Sorex* et *Crocidura* dans des conditions identiques (Catzeflis *et al.* 1982; Catzeflis 1983). Chaque électromorphe d'un isozyme a été considéré comme représentant l'expression d'un allèle du gène correspondant.

Les fréquences des différents allèles, calculées pour chaque locus et chaque population, ont permis d'établir la distance génétique standard D_{xy} entre deux populations comparées X et Y selon la formule de Nei (1972), ainsi que l'hétérozygotie théorique (parfois aussi dénommée « Hétérozygotie calculée » dans la littérature) selon la relation de Hardy-Weinberg. L'hétérozygotie observée a été obtenue par comptage direct des hétérozygotes sur les zymogrammes et correspond au paramètre H_i dans Dobzhansky *et al.* (1977).

RÉSULTATS

Parmi les 31 loci étudiés, 11 ne présentent qu'un seul et même allèle chez les 9 populations analysées; les fréquences alléliques des 20 autres loci (loci polymorphes) sont données au tableau 4.

Tableau 4

Fréquences alléliques pour les 20 loci polymorphes dans les 9 populations analysées

Espèce (population)		Nfo-1	Nfo-2	Nfo-3	Nfo-4	Nfo-5	Nfo-6	Nan-1	Nan-2	Nan-3
Nombre de génomes		12	24	12	6	10	16	24	6	12
Locus	Allèle									
Acon-1	+100	—	0.33	—	1.00	—	—	—	—	—
	+110	1.00	0.67	1.00	—	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Acp-1	+560	—	—	—	—	—	—	—	0.50	—
	+650	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50	1.00
Alb-1	+ 90	1.00	0.96	1.00	1.00	1.00	1.00	—	—	—
	+ 93	—	—	—	—	—	—	1.00	1.00	1.00
	+ 95	—	0.04	—	—	—	—	—	—	—
Es-1	+ 78	—	0.15	—	—	—	—	—	—	0.16
	+ 83	—	0.85	0.55	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	0.84
	+ 87	1.00	—	0.45	—	0.10	—	—	—	—
Es-2	+ 85	—	0.04	—	—	—	—	—	—	0.08
	+ 93	—	0.88	0.50	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00	0.92
	+ 95	—	0.08	—	—	—	—	—	—	—
	+ 97	1.00	—	—	—	0.20	—	—	—	—
	+106	—	—	0.50	—	—	—	—	—	—

Espèce (population)		Nfo-1	Nfo-2	Nfo-3	Nfo-4	Nfo-5	Nfo-6	Nan-1	Nan-2	Nan-3
Nombre de génomes		12	24	12	6	10	16	24	6	12
Es-3	+ 82	—	—	—	—	—	0.12	—	—	—
	+ 85	0.84	0.46	1.00	1.00	0.40	0.88	—	—	—
	+ 90	—	—	—	—	—	—	1.00	1.00	1.00
	+ 93	—	—	—	—	0.50	—	—	—	—
	+ 95	0.16	0.54	—	—	0.10	—	—	—	—
Fh-1	− 35	1.00	1.00	0.84	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	+ 58	—	—	0.16	—	—	—	—	—	—
Gpd-1	+100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.88	1.00	0.84
	+ 36	—	—	—	—	—	—	0.04	—	—
	− 70	—	—	—	—	—	—	0.08	—	0.16
Got-2	− 60	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.84
	−250	—	—	—	—	—	—	—	—	0.16
Hk-1	+116	1.00	1.00	1.00	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00	1.00
	+140	—	—	—	—	0.20	—	—	—	—
Icd-2	− 45	0.16	—	—	—	—	—	—	—	—
	− 53	0.84	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	0.96	1.00	1.00
	− 65	—	—	—	—	—	0.06	0.04	—	—
Ldh-2	− 89	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	—	1.00	1.00	1.00
	− 92	—	—	—	—	—	1.00	—	—	—
Mdh-2	− 93	1.00	0.93	1.00	1.00	1.00	1.00	—	—	1.00
	−100	—	0.07	—	—	—	—	1.00	1.00	—
Mpi-1	+155	0.50	0.75	—	—	1.00	0.06	—	—	—
	+192	0.50	0.25	1.00	1.00	—	0.94	1.00	0.66	1.00
	+237	—	—	—	—	—	—	—	0.34	—
Pgd-1	+ 89	—	0.11	—	—	—	—	—	—	—
	+105	0.84	0.89	1.00	1.00	0.90	1.00	0.85	1.00	1.00
	+114	0.16	—	—	—	0.10	—	0.15	—	—
Pgm-1	+ 89	0.33	0.94	0.58	—	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	+ 98	0.67	0.03	—	—	—	—	—	—	—
	+110	—	0.03	0.34	1.00	—	—	—	—	—
	+122	—	—	0.08	—	—	—	—	—	—
Prot-2	− 82	—	—	—	—	—	—	0.04	—	—
	− 86	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.96	1.00	1.00
Sod-3	+100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	—	—	—
	+110	—	—	—	—	—	—	1.00	1.00	1.00
Trf-1	+119	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50	1.00	1.00	1.00
	+195	—	—	—	—	—	0.50	—	—	—
Xdh-1	+100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.16
	+106	—	—	—	—	—	—	—	—	0.84

Le nombre moyen d'allèles par locus et par échantillon (population géographique) est de 1,15 ± 0,09 (étendue 1,00 à 1,35). Les loci les plus polymorphes sont Es-2, Es-3 et Pgm-1; la répartition géographique des allèles de Pgm-1 est illustrée par la figure 2 pour les 6 populations de *N. fodiens*.

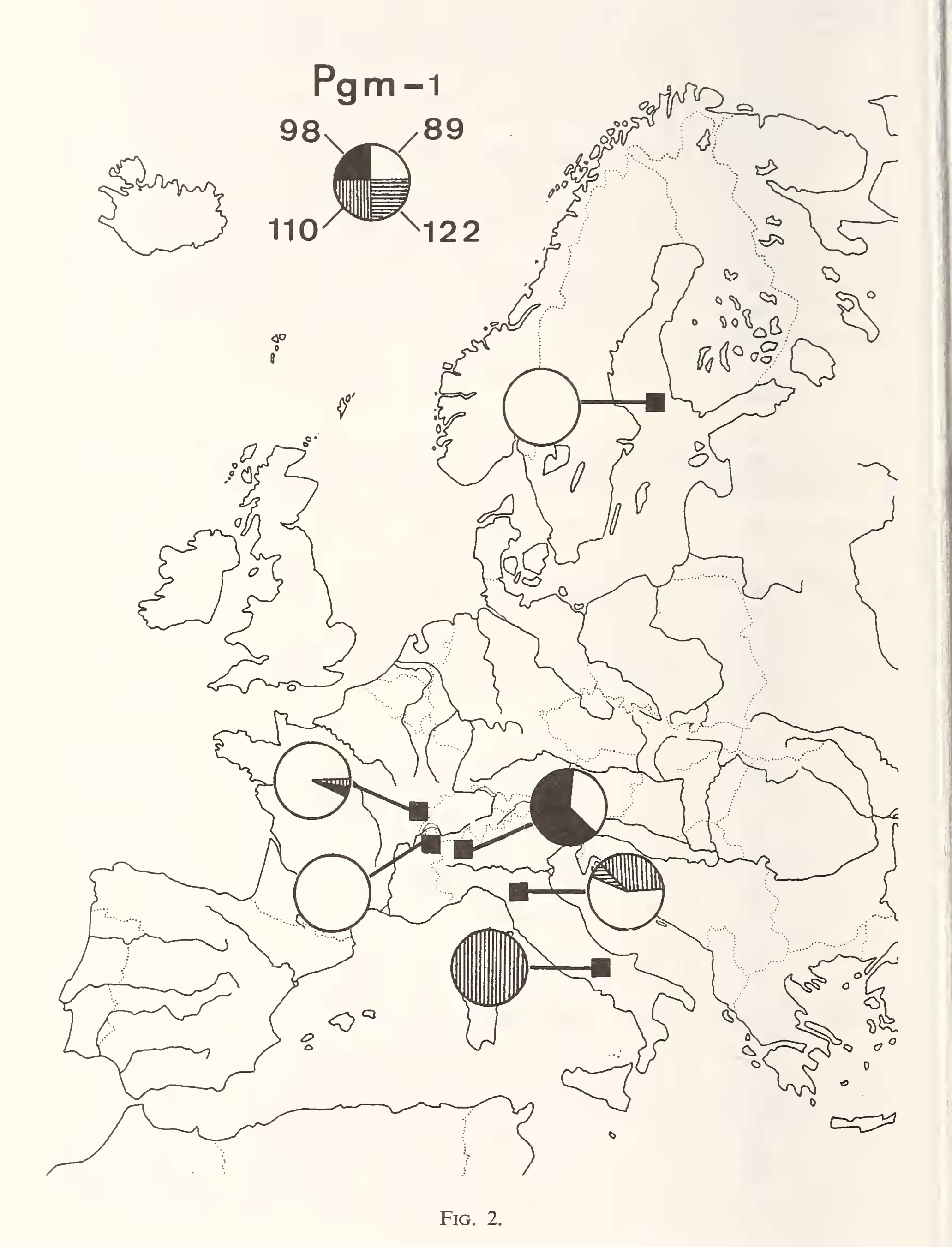


Fig. 2.

Répartition géographique des allèles du locus Pgm-1 chez les 6 échantillons de *N. fodiens*.

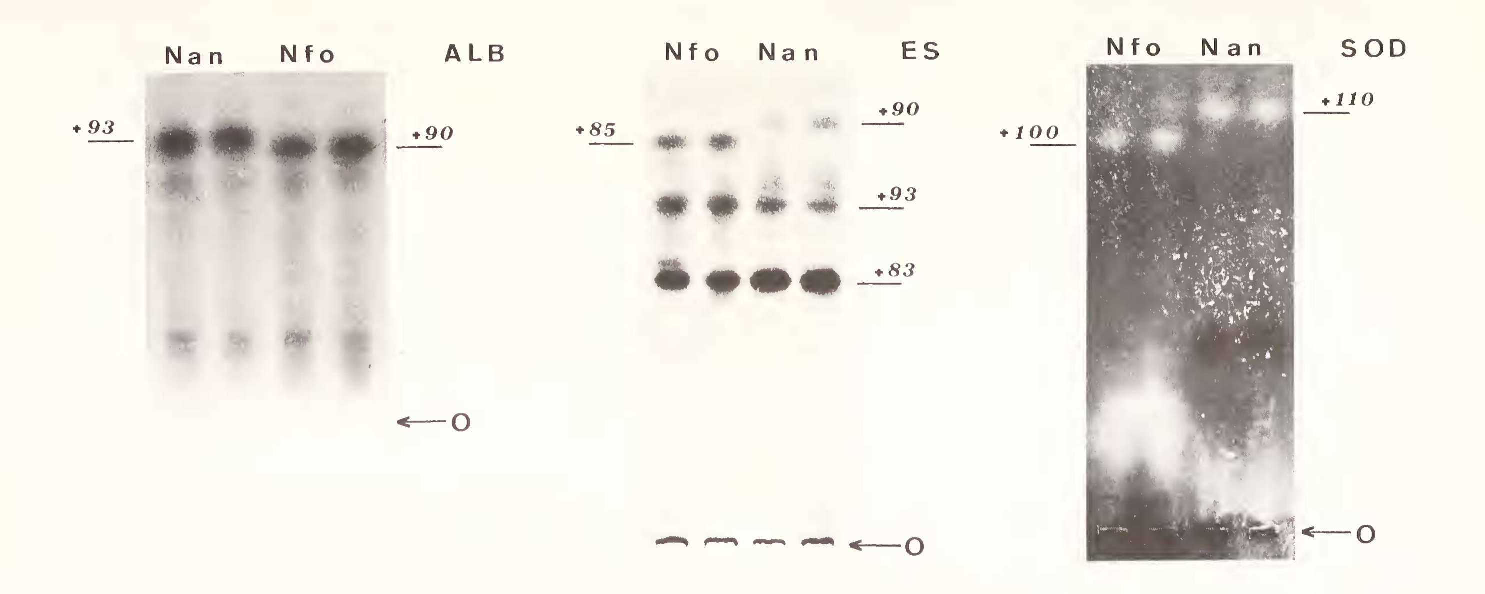


FIG. 3.

Zymogrammes de l'Albumine (ALB), des Estérases-1, -2 et -3 (ES) et de la Superoxide dismutase-3 (SOD). O: lieu d'insertion des échantillons.

Le polymorphisme biochimique des loci les plus variables, tel Pgm-1, ne montre pas ou peu de relation avec l'origine géographique des échantillons analysés. De même, il apparaît qu'il n'y a pas de corrélation entre la distance génétique (*r* de PEARSON = 0,396) et la distance géographique séparant les différents échantillons d'une même espèce. Le coefficient de corrélation cophénétique entre la matrice des distances génétiques (tableau 6) et celle des logarithmes naturels des distances géographiques vaut 0,504, ce qui signifie que tout au plus 25% des deux matrices comparées varie de façon dépendante.

Parmi l'ensemble des 65 électromorphes détectés, 22 (33,8%) n'ont été observés que chez *N. fodiens* et 10 (13,4%) seulement chez *N. anomalus*; parmi ces derniers, trois (dont la fréquence vaut 1.00 dans les échantillons étudiés) ont une valeur diagnostique pour *N. anomalus*: ce sont ALB-1 (+93), ES-3 (+90) et SOD-3 (+110); ES-3 et SOD-3 sont les isozymes à migration la plus anodique dans les systèmes décrits au tableau 3. La valeur diagnostique de ces 3 électromorphes caractéristiques de *N. anomalus* (figure 3 et tableau 4) est relative, car il n'est pas exclu que des analyses ultérieures puissent mettre en évidence l'un de ces électromorphes chez d'autres populations de *N. fodiens*; toutefois, ces caractères biochimiques peuvent établir un diagnostic spécifique lorsque la morphologie comparée ne le permet pas.

La variabilité génétique à l'intérieur des populations ou espèces étudiées est présentée au tableau 5: l'hétérozygotie observée (moyenne 2,54 ± 1,55%) est en général inférieure à l'hétérozygotie théorique (moyenne 3.98 ± 2.11%). A effectif comparable (Nfo-1 et Nan-3, Nfo-2 et Nan-1), les échantillons de *N. fodiens* sont plus variables que ceux de *N. anomalus:* hétérozygoties théoriques respectivement 5,64% et 7,35% versus 3,96% et 2,00%.

TABLEAU 5

Variabilité génétique:
pour chaque population; moyenne par espèce; moyenne pour les 9 échantillons
H_{obser}: Hétérozygotie observée
$H_{théor}$: Hétérozygotie théorique

Population	Nfo-1	Nfo-2	Nfo-3	Nfo-4	Nfo-5	Nfo-6	Nan-1	Nan-2	Nan-3
H_{obser}	1.88	3.75	3.26	0.00	5.19	3.28	1.74	3.22	0.54
$H_{théor}$	5.64	7.35	5.80	0.00	5.09	3.01	2.00	3.03	3.96

Espèce	N. fodiens	N. anomalus	Genre Neomys
H_{obser}	2.89 ± 1.61	1.83 ± 1.09	2.54 ± 1.55
$H_{théor}$	4.48 ± 2.37	2.99 ± 0.80	3.98 ± 2.11

A partir des fréquences alléliques observées aux 31 loci, les distances génétiques entre toutes les populations comparées par paires ont été calculées et sont présentées sous forme d'une matrice (tableau 6). Entre population conspécifiques, la distance génétique s'étend de 0,013 à 0,143 (moyenne 0,078 ± 0,035), valeurs toujours inférieures aux distances génétiques séparant *N. fodiens* de *N. anomalus*: de 0,154 à 0,261, moyenne 0,193 ± 0,032.

TABLEAU 6

Matrice des distances génétiques standard (calculées selon NEI 1972) entre populations

	Nfo-1	Nfo-2	Nfo-3	Nfo-4	Nfo-5	Nfo-6	Nan-1	Nan-2
Nfo-2	.091							
Nfo-3	.061	.053						
Nfo-4	.146	.078	.064					
Nfo-5	.087	.017	.065	.119				
Nfo-6	.143	.075	.066	.113	.087			
Nan-1	.250	.158	.170	.219	.176	.188		
Nan-2	.261	.162	.184	.234	.177	.202	.013	
Nan-3	.234	.154	.158	.211	.168	.180	.061	.075

Les distances génétiques ainsi obtenues sont illustrées par un dendrogramme (figure 4) construit selon la méthode UPGMA (SNEATH & SOKAL 1973); le coefficient de corrélation cophénétique, ou *r* de PEARSON, entre les valeurs originales (matrice du tableau 6) et les valeurs transformées (dendrogramme UPGMA) vaut 0,910, ce qui indique une très faible distorsion des données de la matrice originale.

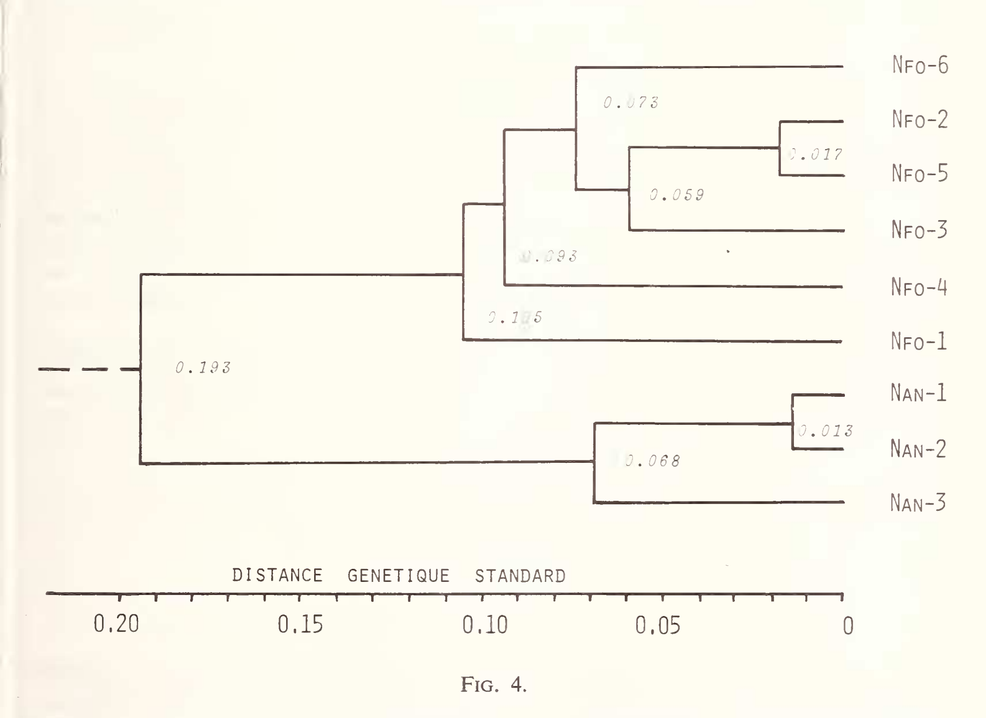


FIG. 4.

Dendrogramme dérivé de la matrice des distances génétiques (tableau 6) par la méthode UPGMA.

DISCUSSION

Nombre moyen d'allèles par locus

Le nombre moyen d'allèles par locus et par population chez les 9 échantillons du genre *Neomys* (1,15 ± 0,09) est comparable à celui noté chez d'autres Soricidae, ainsi parmi 11 populations du genre *Sorex* (1,20 ± 0,10: Catzeflis *et al.* 1982) ou parmi des populations du genre *Crocidura* (1,10 ± 0,11: Catalan & Poitevin 1981; 1,10 ± 0,06: Catzeflis 1983). Au contraire, le nombre moyen d'allèles par locus et par population présenté par Gebczynski & Jacek (1980) est nettement plus élevé: 2,00 et 2,18 chez *N. anomalus* et *N. fodiens*, 1.82 chez *Sorex araneus* et *S. minutus*. Cette différence non négligeable entre leurs résultats et les nôtres provient peut-être du petit nombre de loci — 11 — étudiés par ces deux auteurs.

En général, le nombre moyen d'allèles par locus décelable par cette méthode d'électrophorèse est compris entre 1,00 et 1,30 chez les Mammifères, ainsi 1,27 chez 10 populations de *Thomomys talpoides* (Nevo *et al.* 1974). 1,12 chez 6 populations de *Pitymys multiplex* (Graf & Meylan, 1980) ou encore 1,14 chez 11 populations de *Dipodomys merriami* (Johnson & Selander 1971).

Hétérozygotie

L'hétérozygotie observée chez les échantillons de *Neomys* (moyenne 2,54%) est du même ordre de grandeur que celle trouvée chez les genres *Sorex* (2,04%: Catzeflis *et al.* 1982) et *Crocidura* (moyenne sur 8 populations appartenant à 3 espèces: 1,77% — données pers. —).

L'écart entre les valeurs théoriques et observées de l'hétérozygotie (tableau 5) est particulièrement marqué chez les échantillons Nfo-1, Nfo-2, Nfo-3 et Nan-3, chez qui l'hétérozygotie observée ne représente que 13,6 à 56,0% de la valeur prédite par la relation de Hardy-Weinberg. Il semble que cette différence soit due à un défaut d'hétérozygotes aux loci polymorphes et non pas à la méthodologie particulière employée car ce sont différents loci parmi les différentes populations qui montrent une hétérozygotie observée réduite (tableau 7). Par exemple, l'examen des 9 loci polymorphes de l'échantillon Nfo-2 montre que les hétérozygoties théoriques et observées diffèrent fortement à 6 d'entre eux (tableau 7) et 14 à 15 hétérozygotes supplémentaires sont nécessaires pour rétablir l'équilibre prédit par la relation de Hardy-Weinberg.

Quelle est la cause de cette réduction de la variabilité génétique chez certains échantillons de *Neomys*? Nous ne le savons pas et la biologie des populations de Musaraignes aquatiques n'est pas assez connue à ce jour pour pouvoir avancer des explications à ce paradoxe; l'hypothèse d'une organisation en dèmes entre lesquels la panmixie ne serait pas effective pourrait rendre compte de nos résultats biochimiques.

Quoiqu'il en soit, l'hétérozygotie théorique notée chez *Neomys* (moyenne sur les 9 populations: 3,98%) est semblable à la valeur moyenne (3,90%) présentée par Avise & Aquadro (1982) pour 50 espèces de Mammifères.

Distances génétiques entre échantillons comparés

Parmi les 9 populations de *Neomys*, trois montrent une différenciation génétique particulièrement élevée: ce sont Nfo-1 (Haudères, dans les Alpes), Nfo-4 (Opi, dans les Abruzzes) et Nfo-6 (île d'Åland, dans le golfe de Bothnie). Si le phénomène de la dérive

TABLEAU 7

Hétérozygoties observée et théorique à chaque locus polymorphe chez les échantillons Nfo-2 et Nan-3.

Population:	Nfo-2: 13 ind.		Nan-3: 6 ind.	
	Hétérozygoties		Hétérozygoties	
Locus	observée %	théorique %	observée %	théorique %
Acon-1	0.0	44.0	0.0	0.0
Alb-1	7.7	7.7	0.0	0.0
Es-1	15.4	25.0	0.0	27.0
Es-2	23.1	21.7	16.7	14.7
Es-3	30.8	49.0	0.0	0.0
Gpd-1	0.0	0.0	0.0	27.0
Got-2	0.0	0.0	0.0	27.0
Mdh-2	0.0	12.0	0.0	0.0
Mpi-1	15.4	37.0	0.0	0.0
Pgd-1	7.7	20.0	0.0	0.0
Pgm-1	15.4	11.4	0.0	0.0
Xdh-1	0.0	0.0	0.0	27.0
Moyenne (sur 31 loci)	3.75	7.35	0.54	3.96

génétique peut être invoqué pour la population insulaire Nfo-6, par contre l'isolement génétique des deux autres échantillons, originaires de massifs montagneux, est difficilement explicable car nous ignorons si les peuplements de *N. fodiens* sont continus dans l'espace et dans le temps.

En conséquence de ceci, les distances génétiques entre populations locales au sein des deux espèces étudiées sont particulièrement élevées: en moyenne 0,078 ± 0,035, valeurs supérieures à celles observées entre populations conspécifiques dans le genre *Sorex* (0,027 ± 0,023: CATZEFLIS *et al.* 1982). En général, chez les Mammifères, la distance génétique moyenne séparant des populations géographiques d'une même espèce est inférieure à 0,050, ainsi 0,013 chez les Arvicolidae (GRAF, 1982), 0,023 dans le genre *Macrotus* (GREENBAUM & BAKER, 1976) ou encore 0,030 chez *Peromyscus boylii* (ZIMMERMAN *et al.* 1978).

Au niveau générique, *N. fodiens* et *N. anomalus* sont génétiquement peu différenciées, la distance génétique moyenne les séparant vaut 0,193 (de 0,154 à 0,261), valeur comprise entre celle observée parmi les espèces de *Sorex* du groupe chromosomique XY_1Y_2 — 0,055 ± 0,028 — et celle observée entre *Sorex minutus* et *S. araneus*, *S. granarius* ou *S. coronatus* — 0,281 ± 0,072 — (CATZEFLIS *et al.* 1982) ou encore entre les trois espèces européennes du genre *Crocidura* — 0,386 ± 0,048 — (CATZEFLIS 1983).

Nos résultats s'opposent nettement à ceux publiés par GEBCZYNSKI & JACEK (1980): à partir des fréquences alléliques publiées par ces auteurs, nous calculons une distance

génétique (toujours selon NEI 1972) de 0,053 entre les populations de *N. fodiens* et *N. anomalus* qu'ils ont étudiées; cette valeur, très basse, est comparable à celles que nous observons entre populations conspécifiques dans notre étude. D'autre part, les calculs de la similarité génétique (selon ROGERS 1972 et selon NEI 1972) présentés par GEBCZYNSKI & JACEK (1980) ne s'appliquent pas à l'ensemble de leurs fréquences alléliques car ces auteurs ont, pour une raison qui nous échappe, négligé de tenir compte de 3 loci monomorphes dans leurs calculs. Enfin, les fréquences alléliques présentées par GEBCZYNSKI & JACEK sont incompatibles avec les effectifs des populations qu'ils prétendent avoir analysés et ceci est probablement à l'origine du désaccord entre leurs résultats et les nôtres.

Le cas des 2 espèces européennes de *Neomys* se rapproche de celui du genre *Microdipodops* étudié par HAFNER *et al.* (1979): les deux seules espèces du genre *Microdipodops* sont morphologiquement des espèces jumelles, au caryotype très semblable, et dont les différences morphologiques sont, comme chez *Neomys*, liées à la fonction et à mettre en relation avec les habitudes alimentaires. Parmi les 23 loci étudiés par HAFNER *et al.* (1979), par une méthode similaire à la nôtre, 3 sont fixés pour des allèles différents et la distance génétique (selon NEI 1972) séparant les deux espèces vaut 0,247.

En conclusion à ce qui précède, la spéciation du genre *Neomys* est nettement plus récente que celle qui a donné naissance aux trois espèces européennes du genre *Crocidura* ou encore aux *Sorex* morphologiquement bien différenciées tels *S. minutus*, *S. alpinus* et *S. samniticus*. Ainsi, la faible distance génétique entre les deux espèces de *Neomys* (0,193 ± 0,032) confirme l'opinion de SPITZENBERGER (1980) comme quoi la spéciation (différenciation) de ces deux espèces est un fait plutôt récent.

REMERCIEMENTS

Ce travail fait partie d'une thèse de doctorat sur la taxonomie biochimique des Soricidae en Europe (Catzeflis 1984). Je remercie M. le professeur P. Vogel, qui m'a proposé le sujet, pour son intérêt et ses précieux conseils.

Toute ma reconnaissance va à J. D. Graf, J. Hausser, A. Meylan, P. Taberlet et P. Vogel qui ont capturé une partie des animaux nécessaires à cette étude.

RÉSUMÉ

Quelques populations des deux espèces de musaraignes à mœurs aquatiques *N. fodiens* et *N. anomalus* ont été comparées biochimiquement par la méthode de l'électrophorèse des protéines homologues.

Le nombre moyen d'allèles par locus (1,15 ± 0,09) et l'hétérozygotie théorique (3,98 ± 2,11%) chez *Neomys* sont comparables à ceux notés chez d'autres Mammifères.

La distance génétique (selon NEI 1972) entre populations géographiques est particulièrement élevée (0,078 ± 0,035). Au niveau générique, la distance génétique entre *N. fodiens* et *N. anomalus* vaut 0,193 ± 0,032, une valeur qui s'accorde bien avec l'idée d'une cladogenèse relativement récente entre ces deux taxons.

Ces résultats sont comparés avec ceux obtenus par la même technique chez d'autres espèces de la famille des Soricidae.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Spitzmausarten *Neomys fodiens* und *N. anomalus* stehen sich wegen ihrer morphologischen, karyologischen und oekologischen Aehnlichkeit offenbar sehr nahe. In der vorliegenden Arbeit wird diese Hypothese überprüft indem mittels der Elektro-

phorese von Isoproteinen die genetischen Distanzen (berechnet nach NEI 1972) geschätzt werden.

Die biochemische Analyse ergibt folgende Resultate:

— Von den 31 untersuchten Isoproteinen sind 11 monomorph, d.h. sie zeigen in den 9 Populationen nur ein Elektromorph; die verbleibenden 20 sind polymorph, repräsentiert durch 54 elektrophoretische Varianten, von welchen 3 nur bei *N. anomalus* beobachtet werden konnten.
— Die genetischen Distanzen zwischen intraspezifischen Populationen sind im Vergleich zu andern Säugerarten erstaunlich hoch.
— Die interspezifische genetische Distanz zwischen *N. fodiens* und *N. anomalus* beträgt 0,193 ± 0,032, Wert, der die relativ rezente Kladogenese dieser beiden Arten bestätig.

Die Ergebnisse werden mit solchen verglichen, die mit gleicher Technik bei anderen Soriciden erzielt worden sind.

BIBLIOGRAPHIE

AVISE, J. C. et C. F. AQUADRO. 1982. A comparative summary of genetic distances in the Vertebrates. Patterns and correlations. *Evol. Biol.* 15: 151-185.

AYALA, F. J., J. R. POWELL, M. L. TRACY, C. A. MOURAO et S. PEREZ-SALAS. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* 70: 113-119.

BREWER, G. J. 1970. An introduction to isozyme techniques. *Academic Press, New York*, 186 pp.

BÜHLER, P. 1964. Zur Gattungs- und Artbestimmung von *Neomys*-Schädeln — Gleichzeitig eine Einführung in die Methodik der optimalen Trennung zweier systematischer Einheiten mit Hilfe mehrerer Merkmale. *Z. Säugetierk.* 29: 65-93.

CATALAN, J. et F. POITEVIN. 1981. Les Crocidures du midi de la France: leurs caractéristiques génétiques et morphologiques; la place des populations corses. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris* 292: 1017-1020.

CATZEFLIS, F. 1983. Relations génétiques entre trois espèces du genre *Crocidura* (Soricidae, Mammalia) en Europe. *Mammalia* 47: 229-236.

CATZEFLIS, F. 1984. Systématique biochimique taxonomie et phylogénie des Musaraignes d'Europe (Soricidae, Mammalia). Thèse de doctorat, Université de Lausanne.

CATZEFLIS, F., J. D. GRAF, J. HAUSSER et P. VOGEL. 1982. Comparaison biochimique des Musaraignes du genre *Sorex* en Europe occidentale (Soricidae, Mammalia). *Z. zool. Syst. Evolutions-forsch.* 20: 223-233.

CLAYTON, J. W. et D. N. TRETIAK. 1972. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *J. Fish. Res. Bd Can.* 29: 1169-1172.

CORBET, G. et D. OVENDEN. 1980. The Mammals of Britain and Europe. *W. Collins Sons & Co, London*, 253 pp.

DAVIDIAN-BRITTON, J. 1976. Premières données sur la structure génétique du complexe d'espèces de *Mus musculus* dans le bassin méditerranéen. *Thèse, USTL, Montpellier*.

DOBZHANSKY, T., F. J. AYALA, G. L. STEBBINS et J. VALENTINE. 1977. Evolution. *Freeman and Co, San Francisco*, 572 pp.

FREDGA, K. et A. LEVAN. 1969. The chromosomes of the european water shrew (*Neomys fodiens*). *Hereditas* 62: 348-356.

GEBCZYNSKI, M. et L. JACEK. 1980. Biochemical variation in four species of Insectivora. *Acta Theriol.* 25: 385-392.

GRAF, J. D. 1982. Génétique biochimique, zoogéographie et taxonomie des Arvicolidae (Mammalia, Rodentia). *Revue suisse Zool.* 89: 749-787.

GRAF, J. D. et A. MEYLAN. 1980. Polymorphisme chromosomique et biochimique chez *Pitymys multiplex* (Mammalia, Rodentia). *Z. Säugetierk.* 45: 133-148.

GREENBAUM, I. F. et R. J. BAKER. 1976. Evolutionary relationships in *Macrotus* (Mammalia: Chiroptera): biochemical variation and karyology. *Syst. Zool.* 25:15-25.

HAFNER, D. J., J. C. HAFNER et M. HAFNER. 1979. Systematic status of kangaroo mice, genus *Microdipodops*: morphometric, chromosomal, and protein analyses. *J. Mamm.* 60: 1-10.

HARRIS, H. et D. A. HOPKINSON. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. *North Holland, Amsterdam.*

JOHNSON, W. E. et R. K. SELANDER. 1971. Protein variation and systematics in Kangaroo rats (genus *Dipodomys*). *Syst. Zool.* 20: 377-405.

MEYLAN, A. 1966. Données nouvelles sur les chromosomes des Insectivores européens (Mammalia). *Revue suisse Zool.* 73: 548-558.

NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.

NEVO, E., Y. J. KIM, C. R. SHAW et C. S. THAELER. 1974. Genetic variation, selection and speciation in *Thomomys talpoides* pocket gophers. *Evolution* 28: 1-23.

NIETHAMMER, J. 1977. Ein syntopes Vorkommen der Wasserspitzmäuse *Neomys fodiens* und *Neomys anomalus*. *Z. Säugetierk.* 42: 1-6.

NORES, C., J. L. SANCHEZ CANALS, A. DE CASTRO et G. R. GONZALEZ. 1982. Variation du genre *Neomys* Kaup, 1829 (Mammalia, Insectivora) dans le secteur cantabro-galicien de la péninsule ibérique. *Mammalia* 46: 361-373.

ROGERS, J. S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance *Univ. Texas Publ.* 7213: 145-153.

SELANDER, R. K., M. H. SMITH, S. Y. YANG, W. E. JOHNSON et J. B. GENTRY. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the oldfield mouse (*Peromyscus polionotus*). Studies in Genetics VI. *Univ. Texas Publ.* 7103: 49-90.

SHAW, C. R. et R. PRASAD. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4: 297-320.

SNEATH, P. H. A. et R. R. SOKAL. 1973. Numerical taxonomy. *Freeman, San Francisco.*

SPITZENBERGER, F. 1980. Sumpf- und Wasserspitzmaus (*Neomys anomalus* Cabrera 1907 und *Neomys fodiens* Pennant 1771) in Oesterreich. *Mitt. Abt. Zool. Landesmus. Joanneum* 9: 1-39.

TABERLET, P. 1982. Hauteurs mandibulaires de *Neomys anomalus milleri* Mottaz, 1907 et de *Neomys f. fodiens* (Pennant, 1771) (Insectivora, Soricidae) dans le Bas-Chablais (Haute-Savoie). *Mammalia* 46: 113-116.

TVRTKOVIC, N., B. DULIC et M. MRAKOVIC. 1980. Distribution, species characters, and variability of the southern water-shrew, *Neomys anomalus* Cabrera 1907 (Insectivora, Mammalia) in Croatia. *Biosistematika* 6: 187-201.

ZIMMERMAN, E. G., C. W. KILPATRICK et B. J. HART. 1978. The genetics of speciation in the rodent genus *Peromyscus*. *Evolution* 32: 565-579.